

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



FAKTORY INTERAGUJÍCÍ S BAKTERIÁLNÍ RNA POLYMERÁZOU

FACTORS INTERACTING WITH BACTERIAL RNA POLYMERASE

Petra Sudzinová

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Libor Krásný, Ph.D.

Praha, 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Liborovi Krásnému, Ph.D. za trpělivé vedení bakalářské práce, cenné rady a ochotu zabývat se vzniklými problémy, a také všem ostatním členům Laboratoře molekulární genetiky bakterií za trpělivost, podporu a vytvoření příjemné atmosféry.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26.4.2011

Petra Sudzinová

Abstrakt

Bakteriální buňka musí umět rychle měnit svou genovou expresi, aby přežila nestálé okolní podmínky. Nejvýznamnější úroveň, na které dochází ke změnám genové exprese, je transkripce. Klíčovým enzymem transkripce je RNA polymeráza (RNAP), která je regulována transkripčními faktory (TF). Tyto faktory působí na RNAP různými způsoby. V této práci je vytvořen přehled různých bílkovin a jiných faktorů, vlivu jejich funkce na transkripci a mechanismy jejich účinku. Faktory se dají rozdělit podle mnoha kritérií. Hlavním kritériem, podle kterého je sepsána i tato práce, je způsob interakce s RNAP: TF dělíme podle toho, zda se vážou jen na RNAP, nebo vážou DNA a RNAP, nebo interagují s RNA a RNAP. Tato práce přináší ucelený pohled na různé TF, kombinací jejichž působení může bakteriální buňka vytvářet přesnou a žádoucí odpověď genové exprese na změny vyvolané vnějším prostředím.

Abstract

The bacterial cell must be able to rapidly change its gene expression to survive unstable external conditions. Transcription is the key level that affects gene expression. The pivotal enzyme of transcription is RNA polymerase (RNAP). Activity of RNAP is tightly regulated by transcription factors (TFs). These factors affect RNAP in different ways. This work presents an overview of various proteins and others factors, description of their effects on transcription and also mechanisms of their actions. TFs could be divided according to various criteria. In this work, TFs are divided according to how they interact with RNAP: TFs interacting only with RNAP; TFs binding simultaneously DNA and RNAP; TFs interacting with RNA and RNAP. This work presents a comprehensive overview of various TFs that are involved in the bacterial cell's reprogramming of gene expression that is required to withstand the changes in the environment.

klíčová slova: genová exprese, transkripce, RNA polymeráza, transkripční faktory

keywords: gene expression, transcription, RNA polymerase, transcription factors

Obsah

Abstrakt	4
Obsah.....	5
Seznam zkratek	6
1 Úvod	8
2 Bakteriální RNA polymeráza	9
2.1 Podjednotky RNAP	10
3 Transkripce	12
3.1 Promotor	12
3.2 Faktory sigma	13
3.3 Iniclace	14
3.4 Elongace	17
3.5 Terminace	18
4 Regulace iniciace transkripce	19
4.1 Regulace malými molekulami (ppGpp a iNTP)	19
4.2 Regulace transkripčními faktory	21
5 Transkripční faktory interagující s RNAP	24
5.1 Faktory interagující pouze s RNAP	24
5.1.1 Faktory Gre (GreA, GreB)	24
5.1.2 Rnk a Gfh 1	25
5.1.3 DksA	25
5.1.4 TraR	26
5.1.5 RapA (HepA)	26
5.1.6 TRCF a CarD	26
5.1.7 6S RNA	27
5.2 Faktory interagující s DNA a RNAP	28
5.2.1 Faktory Nus (NusA, NusB, NusG a NusE)	28
5.2.2 RfaH	29
5.2.3 Fis	30
5.3 Faktory interagující s RNA a RNAP	31
5.3.1 Rho	31
6 Závěr	33
7 Seznam použité literatury	34

Seznam zkratek

3D model		trojrozměrný model
AK		aminokyselina
ArcA	anaerobic respiratory control	faktor kontroly anaerobního dýchání
Arg	arginine	arginin
Asp	aspartate	asparát
bp	base pair	pár bází
<i>B. subtilis</i>		<i>Bacillus subtilis</i>
cAMP	3'-5'-cyclic adenosine monophosphate	cyklický adenosin monofosfát
CRP	cyclic AMP receptor protein	receptor pro cyklické AMP
CTD	COOH-terminal domain	karboxy-koncová doména
DNA	deoxyribonucleid acid	kyselina deoxyribonukleová
E	core enzyme RNAP	jádro RNAP
$E\sigma^{70}$	RNAP holoenzyme with σ^{70}	RNAP holoenzym s σ^{70}
<i>E. coli</i>		<i>Escherichia coli</i>
Fis	factor for inversion stimulation	faktor pro stimulaci inverze
FNR	fumarate reductase and nitrite reductase	faktor syntézy fumarát a nitrát reduktázy
G-	Gram negative bacteria	Gram negativní bakterie
G+	Gram positive bacteria	Gram pozitivní bakterie
Glu	glutamate	glutamát
IHF	integration host factor	faktor pro integraci do hostitele
iNTP	initiating nucleoside triphosphate	iniciační nukleosidtrifosfát
LPS	lipopolysacharide	lipopolysacharid
Lrp	leucine regulatory protein	protein regulující hladinu leucinu
Lys	lysine	lyzin
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NarL	nitrate anaerobic regulation	regulátor nitrátového dýchání
nt	nucleotide	nukleotid
NT	non-template strain	netemplátové vlákno DNA
NTD	NH ₂ -terminal domain	amino-koncová doména
NTP	nukleoside triphosphate	nukleosidtrifosfát
ppGpp	guanosine 3',5' biphosphate	guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
RNA	ribonucleid acid	kyselina ribonukleová
RNAP	DNA dependent RNA polymerase	RNA polymeráza závislá na DNA
RP _c	closed complex RNAP:promoter	uzavřený komplex RNAP a promotoru

RP _I	intermediate complex	přechodný komplex
RP _o	open complex	otevřený komplex
Rnk	regulator of nucleoside kinase	regulátor nukleosid kinázy
rRNA	ribosomal RNA	ribozomální RNA
TE	transcription elongation	elongace v transkripci
TEC	transcription elongation complex	elongační komplex u transkripce
TF	transcription factor	transkripční faktor
TRC	transcription-repair coupling	oprava chyb na DNA v průběhu transkripce
TRCF	transcription-repair coupling factor	faktor pro opravu chyb v DNA
tRNA	transfer RNA	transferová RNA

1 Úvod

Bakteriální říše je velmi široká a její zástupce můžeme najít v nejrozličnějších přírodních podmínkách. Schopnost adaptace na různá vnější prostředí závisí na citlivé a efektivní regulaci genové exprese. Základním krokem genové exprese je transkripce a hlavním enzymem transkripce je RNA polymeráza (RNAP). Objev tohoto esenciálního enzymu je připisován laboratorům S. Weiss, J. Hurwitz, A. Stevens a J. Bonner. Stalo se tak nezávisle na sobě v roce 1960 (Hurwitz, 2005).

Tato práce se zabývá faktory, které ovlivňují transkripci. Je to široká škála molekul, od podjednotek samotné RNAP přes malé molekuly, jako jsou například iniciační nukleosidtrifosfáty (iNTP), až po bílkoviny, tzv. transkripční faktory (TF). Transkripční faktory se dají rozdělit podle mnoha charakteristik. Cílem této práce bylo představit ze širokého spektra transkripčních faktorů zejména ty, které interagují s RNAP a ovlivňují tak její funkci.

První část práce popisuje základ transkripčního systému: samotnou RNAP a její podjednotky a také mechanismus transkripce, iniciaci, elongaci a terminaci. Ve druhé části je nastíněn způsob regulace iniciace transkripce, a to jak malými molekulami, tak transkripčními faktory. Třetí část je sepsána na základě rozdělení TF podle typu interakce s RNAP. Faktory jsou podle tohoto hlediska rozděleny na interagující s (i) RNAP, (ii) DNA a RNAP a (iii) RNA a RNAP.

2 Bakteriální RNA polymeráza

Bakterie, na rozdíl od archeí a eukaryot, obsahují ve svých buňkách pouze jednu formu DNA-dependentní RNA polymerázy. Jádru enzymu RNAP (E) se skládá z 5 polypeptidových podjednotek ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) a ve formě tohoto pentameru není schopné samo rozpoznat promotor. Za specifitu rozpoznání promotoru a navázání se na něj je potřeba, aby s E interagovala další podjednotka, σ . Komplex jádra a faktoru sigma ($E\sigma$) se nazývá RNAP holoenzym, který je znázorněn na obrázku 1. Podjednotek σ (faktorů sigma) je vícero druhů a každá rozeznává jinou skupinu promotorů s různou specifitou (více 3.2).

Pětice podjednotek $\alpha_2\beta\beta'\omega$ je u bakterií vysoce konzervovaná a její homology nacházíme i archeí a eukaryot. Podjednotka σ je výjimkou, vyskytuje se jen u bakterií. Celková struktura jádra je tedy u bakteriální RNAP podobná RNAP archeí a eukaryot. U těchto organismů pak komplex celé RNAP obsahuje 12 a více podjednotek a dosahuje hmotnosti přesahující 500kDa (Severinov, 2000).

Skládání jádra RNAP probíhá mechanismem *self-assembly*, neboli samouspořádáváním. Dimer podjednotek α vytváří lešení, na které se navazují katalytické podjednotky β a β' . Podjednotka ω není pro bakteriální buňku esenciální a pomáhá β' při navazování na $\alpha_2\beta$ (Haugen et al., 2008).

RNAP má tvar krabího klepeta, který určují podjednotky β a β' . Každá podjednotka představuje jedno rameno klepeta. Mezi rameny klepeta se nachází charakteristický kanál o šířce 27 Å (2,7 nm) což je přesně šířka dvouvláknového DNA templátu. Hluboko uvnitř tohoto kanálu se nachází aktivní místo, pro jehož správnou funkci jsou potřeba dva katalytické Mg^{2+} ionty. (Severinov, 2000)

Na molekule RNAP můžeme pozorovat tři hlavní kanály. (i) Primární kanál, jež zahrnuje DNA-vazebnou svorku (*clamp*) a místo, kam se váže DNA:RNA hybrid. (ii) Sekundární kanál, kudy přichází substrát (iNTP) do aktivního místa enzymu. Tento kanál je mnohem užší než DNA vazebný, prochází skrz celou molekulu RNAP, začíná blízko místa vazby Mg^{2+} iontů a končí na druhé straně enzymu (Severinov, 2000). (iii) *RNA exit channel*, kanál, kudy odchází RNA (Borukhov et al., 2005).

Vazba do, nebo poblíž, těchto kanálů je rozšířený způsob, kterým může docházet k regulaci aktivity RNAP transkripčními faktory.

2.1 Podjednotky RNAP

Detailní struktura 3D bakteriální RNAP je zatím zcela objasněna jen u *Thermus aquaticus* a *Thermus thermophilus* (viz obrázek 1). U modelových organismů *Bacillus subtilis* (G+) a *Escherichia coli* (G-) jsou vytvořeny homologní modely struktury RNAP. Následující charakteristika podjednotek bude ukázána na modelu *E. coli*.

Podjednotky α – jedna podjednotka α je 329 AK dlouhá (Burgess, 1969), molekulové hmotnosti 36 kDa, a skládá se ze dvou domén, větší N-koncové, zodpovědné za dimerizaci a vazbu β a β' , a kratší C-koncové. Domény jsou spojeny flexibilní ohebnou spojkou. C-koncová doména hraje důležitou roli při rozpoznávání promotoru a je tak i cílem regulací a účinků některých transkripčních faktorů.

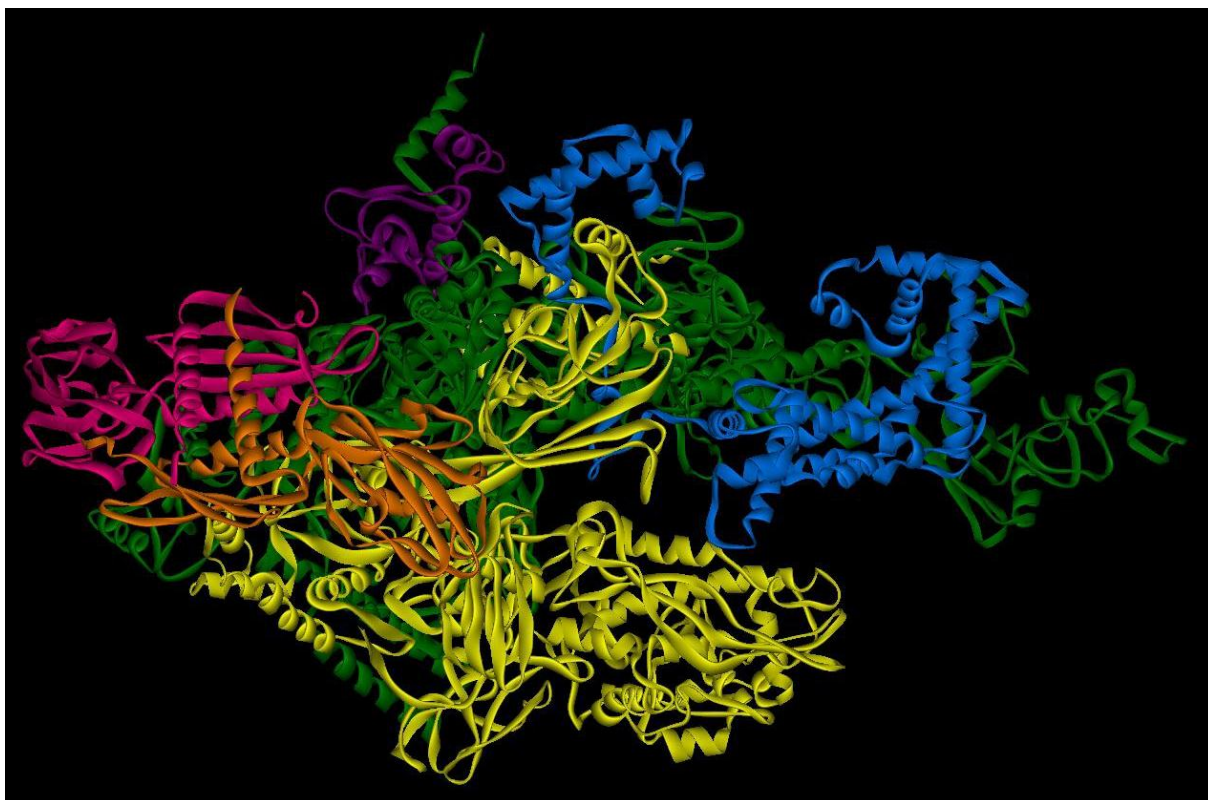
Podjednotka β – o délce 1342 AK a **podjednotka β'** – 1407 AK a molekulové hmotnosti přibližně 150 kDa. β se skládá z 9 vysoce sekvenčně konzervovaných částí (A až I). Podjednotku β' vytváří pouze 8 takových částí (A až H). Tyto části jsou odděleny nekonzervovanými a evolučně variabilními oblastmi. Podjednotky β a β' udávají RNAP charakteristický tvar a obsahují hlavní katalytické místo. Jsou kódovány geny *rpoB* a *rpoC*. (Morse et al., 2002)

Podjednotka ω – délky přibližně 90 AK dosahuje molekulové hmotnosti 10kDa, což z ní dělá nejmenší podjednotku RNAP. Napomáhá vazbě podjednotky β' na vznikající jádro, ale není nutná pro životaschopnost bakterií. Gen, který kóduje podjednotku ω , *rpoZ*, se nachází ve stejném operonu jako *spoT*. Gen *spoT* kóduje enzym ovlivňující koncentraci alarmonu ppGpp v buňce (viz 4.1), což naznačuje, že podjednotka ω hraje také roli ve stringentní odpovědi buňky (Vrentas et al., 2008). Další studie naznačují, že by ω mohla fungovat také jako chaperonin. (Severinov, 2000)

Podjednotka σ – bez této podjednotky se neobejde iniciace transkripce. Je zodpovědná za rozpoznání promotoru a za navázání celé RNAP. Pro transkripci základní sady genů u *E. coli* je zodpovědná podjednotka σ^{70} , pojmenována podle své molekulové hmotnosti, 70 kDa. Podjednotek σ je mnoho druhů; podrobněji je o nich rozepsáno v podkapitole 3.2.

U Gram pozitivních bakterií je součástí RNAP ještě další **podjednotka, δ** , kódována genem *rpoE*. Je požadována pro specifitu jádra enzymu a váže se k jádru RNAP nezávisle na faktoru σ . (Lampe et al., 1988; Xue et al., 2010).

Další podjednotka, přítomná jen u G+ bakterií, je **podjednotka ω_1** . Kódována je genem *yzkG*. Její přesná role v buňce není zatím objasněna. (Jako podjednotka ω_2 je označována podjednotka ω u G–bakterií, homologní struktury.)



Obrázek 1: Struktura RNAP u *Thermus thermophilus*.

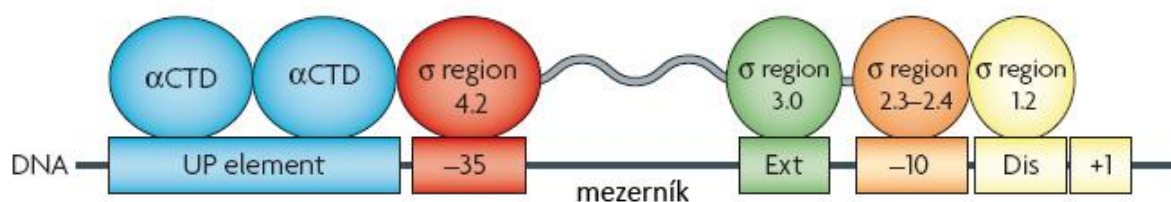
Purpurovou a oranžovou barvou jsou znázorněny dvě podjednotky α , žlutě podjednotka β , zeleně β' , barvou modrou podjednotka σ a fialově podjednotka ω .

3 Transkripce

Transkripce je děj, kdy RNAP nasedne na specifické místo na dvouvláknové DNA, takzvaný promotor, rozplete jednotlivá vlákna DNA od sebe a vytvoří tak transkripční bublinu. Následně přepíše templátové vlákno DNA do RNA podle principu komplementarity. Transkripce zahrnuje tři procesy – iniciaci, elongaci a terminaci.

3.1 Promotor

Promotory umožňují transkripci genů. Nacházejí se před genem proti směru transkripce (*upstream*) a spouštějí jeho přepis z +1 místa. Promotor se dělí na několik základních částí: oblast -10, oblast -35, rozšířená -10 oblast a UP element, které jsou schematicky znázorněny na obrázku 2. UP element se však na rozdíl od ostatních částí nemusí vyskytovat u všech promotorů. Číselné hodnoty udávají vzdálenost v párech bází od počátečního místa transkripce +1, např. oblast -35 najdeme 35 bp proti směru transkripce. Pro rozeznání promotoru podjednotkou σ a následný start transkripce jsou nedůležitější promotorové oblasti -35 a -10.



Obrázek 2: Oblasti promotoru $E\sigma^{70}$ a podjednotky RNAP, které přispívají k jeho rozpoznání.

UP element interaguje s C-koncovými doménami α podjednotek RNAP (α CTD), oblast -35 s oblastí 4.2 podjednotky σ . Ext znamená rozšířenou -10 oblast interagující s oblastí 3 podjednotky σ , oblast -10 interaguje s oblastmi 2.3 a 2.4 podjednotky σ . Dis je diskriminátorový element vázající oblast 1.2 podjednotky σ . +1 označuje místo, odkud začíná transkripce. (Haugen et al., 2008)

Následný popis částí promotorů je opět ilustrován na modelu *E. coli*. (Jiné bakterie mohou mít jiné konsensus sekvence).

Oblast -10 – konsensus sekvence určená hexamerem 5'-TATAAT-3', nacházející se od pozice -12 do -7 proti směru transkripce. Kvůli své sekvenci je také nazývána jako TATA box. Tato oblast je rozpoznávána doménou 2 podjednotky σ , konkrétněji oblastí 2.3 a 2.4.

Rozšířená -10 oblast – 3 až 4 bp dlouhá oblast nacházející se před -10 oblastí, která interaguje s doménou 3 podjednotky σ . Skládá se ze sekvence 5'-TGX-3' od -17 do -14 pozice. (Dehaseth et al., 1998)

Oblast -35 – konsensus sekvence dána hexamerem 5'-TTGACA-3' od -35 do -30 pozice proti směru transkripce. Je rozeznávána doménou 4 (oblastí 4.2) podjednotky σ RNAP.

Oblast mezi -10 a +1 váže oblast 1.2 podjednotky σ . U promotorů, které ji obsahují, ovlivňuje svým složením stabilitu otevřeného komplexu RNAP:promotor (jeden z důležitých kinetických meziproductů při iniciaci transkripce). Když je tato oblast bohatá na GC páry používá se pro ni historicky název „diskriminátor“.

Mezerník (spacer) – obvykle dlouhý 17 bp a odděluje oblasti -35 a -10.

UP element – přibližně 20 bp dlouhá AT bohatá oblast, nacházející se před oblastí -35 u některých promotorů. Vyskytuje se například u promotorů pro sedm hlavních ribozomálních RNA operonů. UP element zvyšuje aktivitu promotoru tím, že na sebe váže C-koncové domény α podjednotek RNAP. (Grainger and Busby, 2008)

3.2 Faktory sigma

Faktor sigma (faktor σ) je nutný k navázání RNAP na promotor. Jádro RNAP bez něj je katalyticky aktivní, ale vazby neschopné. A ani samotný faktor σ není schopen účinně rozpoznat promotor, pravděpodobně díky nefunkční konformaci, která se změní až po vzniku holoenzymu (Severinov, 2000). Nicméně nové výzkumy dokazují, že se faktor σ sám o sobě omezeně a velmi slabě na promotor vázat může (Sevim et al., 2011; Yeh et al., 2011).

První bakteriální faktor σ byl objeven v roce 1969 u *E. coli* jako podjednotka RNAP zodpovědná za výběr promotoru. (Burgess et al., 1969) Po dalších letech výzkumu byly objeveny i jiné faktory σ , které jsou potřebné a esenciální např. v různých fázích sporulace u *B. subtilis* a které jsou zodpovědné za odpovědi na nedostatek živin u *E. coli*. Sekvenováním genomů bakteriální říše se zjistilo, že různé bakterie mají různý počet faktorů σ , jak je vidět v tabulce 1 (Gross et al., 1998 podle Browning and Busby, 2004).

Tabulka 1: Počet faktorů σ v různých bakteriálních druzích.

Bakteriální druh	Počet faktorů σ
<i>Mycoplasma genitalium</i>	1
<i>E.coli</i>	7
<i>B.subtillis</i>	18
<i>Streptomyces coelicolor</i>	63

U *E. coli* najdeme sedm faktorů, v délkách od 173 do 613 AK. Hlavním, tzv. *housekeeping* neboli provozním faktorem σ je σ^{70} , ostatní faktory σ jsou využívány/produkované tehdy, když je potřeba změnit genovou expresi buňky. Faktor σ^{38} (nebo také σ^S) ovlivňuje transkripci v průběhu stacionární fáze, σ^{54} při růstu na nízkém zdroji dusíku, σ^{32} se objevuje jako odpověď na tepelný stres, (*heat shock*), σ^{28} spouští expresi genů řídících chemotaxi a genů pro bičíky, σ^{24} indukuje transkripci produktů, který se podílí na *refoldingu* – znovuuspořádání denaturovaných proteinů a σ^{FecI} ovlivňuje expresi enzymů pro železito-citrátový transport (Grainger and Busby, 2008).

Nejhojnější σ^{70} (σ^A ve většině ostatních bakteriálních druhů) je zodpovědný za rozeznání (a následnou vazbu RNAP) většiny promotorů. Skládá se ze 4 konzervovaných domén, $\sigma^1 - \sigma^4$, které jsou dále rozděleny na oblasti (Haugen et al., 2008).

Faktor σ^{54} je výjimkou mezi faktory σ . Nemá žádnou sekvenční podobnost s σ^{70} , skládá se z jiných strukturních domén a není příbuzný ani ostatním faktorům σ . Holoenzym RNAP s σ^{54} rozpoznává promotorovou sekvenci blízko pozic -12 a -22 proti směru transkripce. σ^{54} dokáže rozeznat tyto sekvence, ale pro úspěšné navázání je potřeba, aby na σ^{54} působil aktivátor Crl, který nese specifickou konzervovanou doménu, která řídí přeskupení komplexu RNAP:promotor (přeskupení je závislé na ATP), což vede k vytvoření otevřeného komplexu (*open complex*) (Browning and Busby, 2004). (σ^{70} na navázání na promotor žádný aktivátor nepotřebuje (Haugen et al., 2008)).

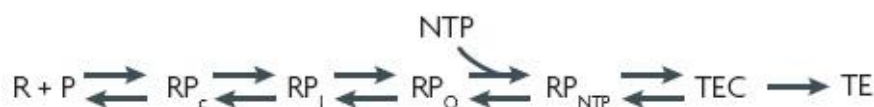
Další výjimkou, stojící za zmínku, je relativně nově objevený osmnáctý faktor σ , z *B. subtilis*. Skládá se totiž ze dvou podjednotek, YvrI a YvrHa. (MacLellan et al., 2009)

Vzhledem ke své důležité funkci při výběru promotoru je aktivita faktorů σ přísně kontrolována. Jedním ze způsobů je soutěžení různých faktorů σ , zodpovědných za odpověď na specifický stres, s hlavním σ^{70} o vazebné místo na RNAP. Další varianta regulace je vykonávána anti- σ faktory, které ovlivňují aktivitu faktorů σ nezávisle na jejich transkripci a translaci (Hughes and Mathee, 1998). Anti- σ faktory fungují tak, že vyvazují faktor σ a ten se pak nemůže vázat na RNAP. Aktivita anti- σ faktorů je regulována navázáním ligandu, kovalentními modifikacemi anebo proteolýzou (Browning and Busby, 2004).

V buňce existují i anti-anti- σ faktory, které naopak regulují aktivitu anti- σ faktorů. Mechanismus této regulace probíhá různými způsoby, od enzymové modifikace po transport anti- σ faktorů ven z buňky (Hughes and Mathee, 1998).

3.3 Iniciace

Při iniciaci transkripce RNAP a promotor vytváří komplex. Tento komplex může existovat ve třech (čtyřech) stavech (Polyakov et al., 1995) – jako uzavřený (RP_c), přechodný (s tvorbou intermediátů), (RP_I), otevřený (RP_o) a raný elongační (TEC), které mezi sebou volně přecházejí, jak je vidět na následujícím schématu. R symbolizuje RNAP, P promotor, třetí písmeno indikuje formu komplexu. TEC (*transcription elongation complex*) znamená transkripční elongační komplex a skládá se z DNA, RNAP a nově vznikající RNA. (Haugen et al., 2008)



Nejprve se RNAP naváže na promotor a vytvoří uzavřený komplex. RNAP obklopuje DNA od pozice -55 do +1 a DNA je stále kompletně dvouvláknová. Ačkoli je tedy RNAP v kontaktu

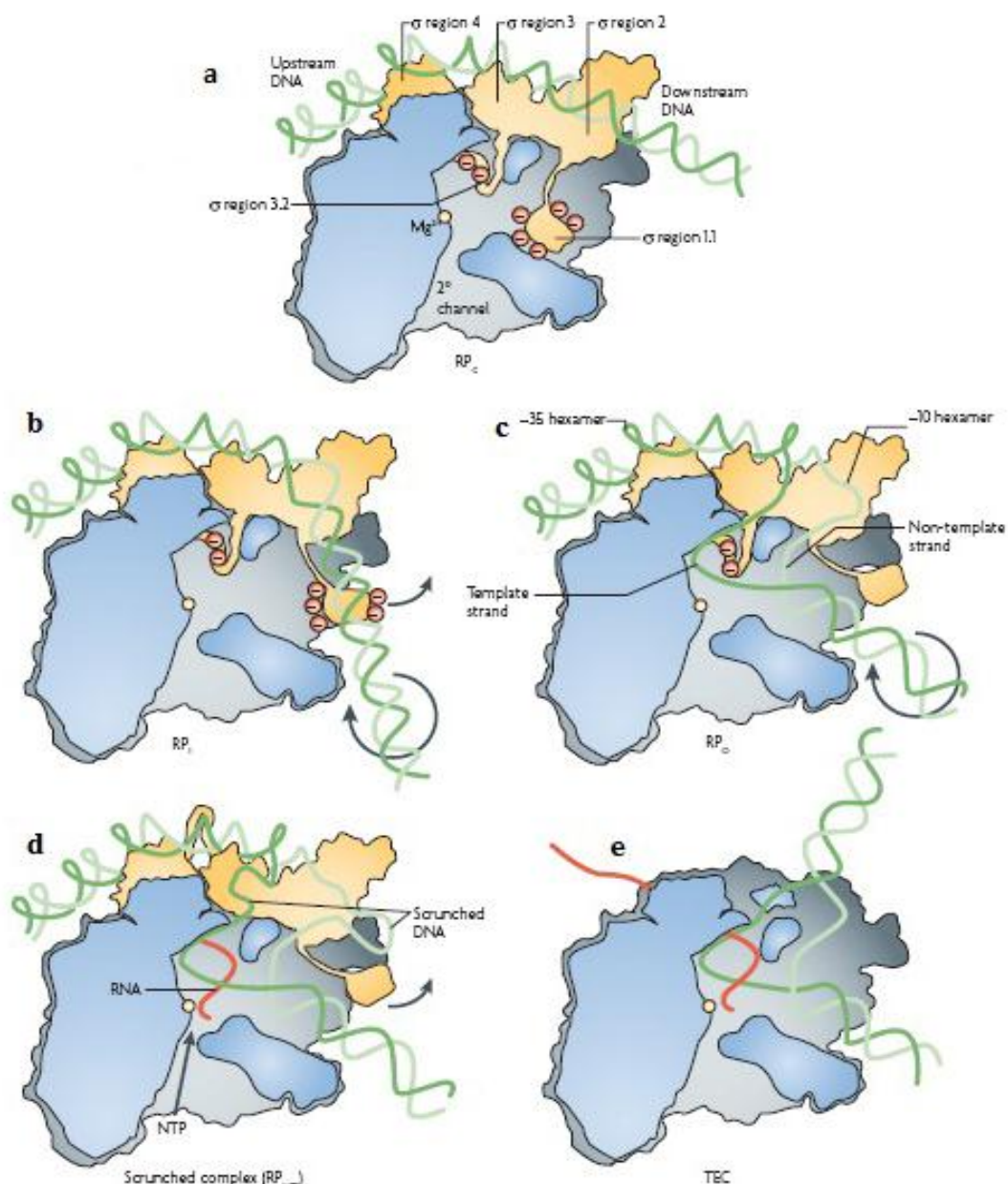
s -35 a -10 promotorovými sekvencemi, DNA ještě nevstoupila do hlavního, primárního kanálu RNAP.

Poté se radikálně změní konformace jak RNAP tak DNA; děj je nazýván jako izomerizace, a začínají se od sebe oddělovat vlákna DNA.

Komplex dále přechází do otevřeného stavu, kde už je na DNA vytvořena transkripční bublina, přibližně od -12 po +2, a je připravena pozice +1 k zařazení prvního (iniciačního) nukleosidutrifosfátu (iNTP). (Haugen et al., 2008)

Názorněji a podrobněji jsou kroky iniciace popsány na obrázku 3.

Následně může u některých promotorů docházet k tzv. abortivní iniciaci. Abortivní iniciace označuje děj, kdy jsou po zahájení transkripce nasyntetizovány v několika cyklech krátké oligonukleotidy, protože se RNAP nedaří zahájit elongaci. Tuto fázi nicméně RNAP překoná a uvolní se (Haugen et al., 2008). Tato vlastnost promotoru, abortivní iniciace, může být důležitá pro jeho regulaci (Liu et al., 1994).



Obrázek 3: Kroky iniciace transkripce

Tmavě zelenou barvou je znázorněno templátové vlákno DNA, světlezelenou nekódující vlákno, červeně vznikající transkript RNA opouštějící kanál RNAP. Mg^{2+} ionty v katalytickém místě jsou znázorněny žlutými kroužky, červené kroužky zastupují záporné náboje aminokyselinových zbytků oblastí 1.1 a 3.2 podjednotky σ .

a – představuje uzavřený komplex RP_c , kde je DNA stále ještě dvouvláknová a nezasahuje do hlavního kanálu.

b – V RP_i se oblast 1.1 vysouvá směrem ven a DNA se po směru transkripce dostává do hlavního kanálu a jednotlivá vlákna se začínají od sebe rozplétat.

c – Vlákna DNA jsou v RP_o od sebe oddělena a templátové vlákno se posouvá směrem k místu párování s prvním, iniciačním, nukleosidem.

d – Je zahájena syntéza RNA. DNA templátové vlákno je posouváno po směru transkripce, NTP k transkripci přicházejí sekundárním kanálem.

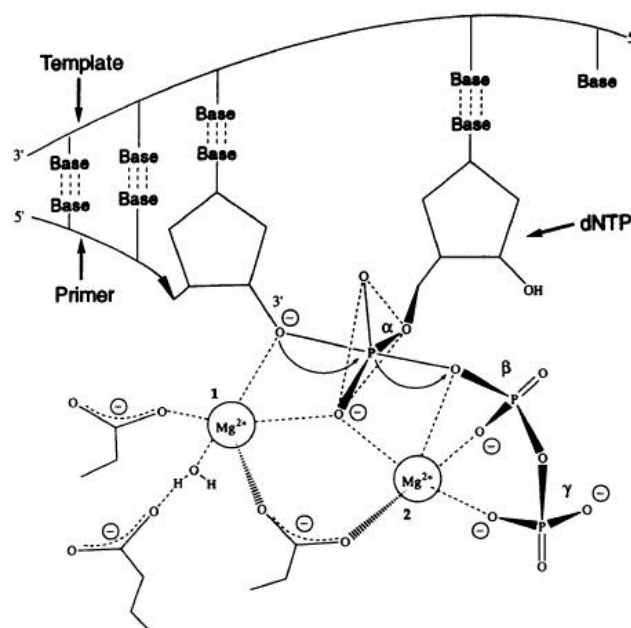
e – Podjednotka σ opustila jádro RNAP, zůstává elongační komplex (TEC) (Haugen et al., 2008).

3.4 Elongace

V elongační fázi transkripce se RNAP po uvolnění z promotoru posouvá podél řetězce DNA a vytváří transkript RNA. Prodlužování řetězce RNA se děje polymerační reakcí. Nově vzniklé vlákno RNA se pak uvolní z hybridu s DNA a DNA samovolně zaujme svou původní dvoušroubovicovou strukturu.

V aktivním místě RNAP se vyskytují dva Mg^{2+} ionty a v případě RNAP dva aspartátové kyselé aminokyselinové zbytky pro jejich koordinaci (jiné enzymy s polymerační schopností mohou obsahovat jiné aminokyseliny). Mg^{2+} ionty jsou v kontaktu s nově vznikajícím RNA vláknem, konkrétně s jeho 3'OH koncem, a s přístupujícími NTP. Mg^{2+} iont označovaný jako 1 interaguje s 3'OH skupinou posledního přidaného nukleotidu a zvyšuje K_a (tedy snižuje pK_a) OH skupiny, což vede k disociaci protonu. Vytvoření negativního náboje na kyslíku pak umožní atak α -fosfátu vstupujícího NTP a posléze vytvoření kovalentní vazby mechanismem nukleofilní substituce (SN_2).

Polymerace tedy probíhá vytvořením vazby mezi 3'OH skupinou ribózy a α -fosfátem za odštěpení pyrofosfátu (obrázek 4). (Steitz et al., 1994)



Obrázek 4: Přejídný stav dvou-iontového mechanismu polymerázové reakce.

(Obrázek ilustruje polymeraci obecně u DNA-dependentních DNA polymeráz, přistupují tedy dNTP. V případě RNAP, RNA polymerázy, se připojují NTP.)

Mg^{2+} číslo 1 napomáhá vazbě 3'OH skupiny ribózy s α -fosfátem dNTP.

Mg^{2+} číslo 2 stabilizuje uspořádání okolních ostatních kyslíků a umožňuje odštěpit pyrofosfát. (Steitz et al., 1994)

3.5 Terminace

Geny náležející do jednoho operonu (organizační jednotka genů, které spadají pod regulaci společného promotoru) jsou transkribovány do jedné společné RNA, dokud RNAP nenarazí na charakteristickou sekvenci na DNA, terminátor.

U bakterií jsou známy dva druhy terminací – nezávislá a závislá na proteinu Rho.

Nezávislá terminace využívá k ukončení transkripce opakované invertované vlásenky (palindromy) bohaté na GC, po kterých následuje několik uridinových zbytků. Terminace závislá na Rho potřebuje ke svému průběhu tento protein, o kterém je více napsáno v oddíle 5.3.1.

4 Regulace iniciace transkripce

Regulace genové exprese je klíčová pro chování buňky a její reakci na změny prostředí. Probíhá na všech úrovních, na úrovni transkripce, translace i v rámci posttranslačních úprav. Regulace na úrovni iniciace transkripce je pravděpodobně nejúčinnější a nejvíce využívaná. Souvisí převážně s odpovědí buňky na nedostatek živin (Paul et al., 2004). Je zprostředkována malými molekulami jako jsou iniciační nukleosidtrifosfáty (iNTP) a guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát (ppGpp). Aktivitu RNAP při iniciaci ovlivňují transkripční faktory a rovněž i nekódující RNA, aminokyseliny, vitamíny (Grundy and Henkin, 2004) a jiné další molekuly (Borukhov et al., 2005).

4.1 Regulace malými molekulami (ppGpp a iNTP)

Koncentrace ppGpp a iNTP se v buňce v průběhu buněčného cyklu mění a ovlivňuje promotory pro rRNA, tRNA a některé mRNA. Obě molekuly spolu úzce spolupracují a schéma jejich spolupráce je znázorněno na obrázku 5. Toto schéma bylo vytvořeno na základě experimentů s modelovou G⁺ bakterií *E. coli*.

Guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát (**ppGpp**) jako takzvaný buněčný alarmon (dalším alarmonem je cAMP) signalizuje buňce nedostatek aminokyselin (tzv. stringentní odpověď). Nacházíme ho v celé bakteriální říši a dokonce i v chloroplastech (Takahashi et al., 2004), pohlčených prokaryotních organismech. Vyskytuje se ve formě guanosin tetra- (ppGpp) nebo penta-fosfátu (pppGpp) a váže se přímo do sekundárního kanálu RNAP.

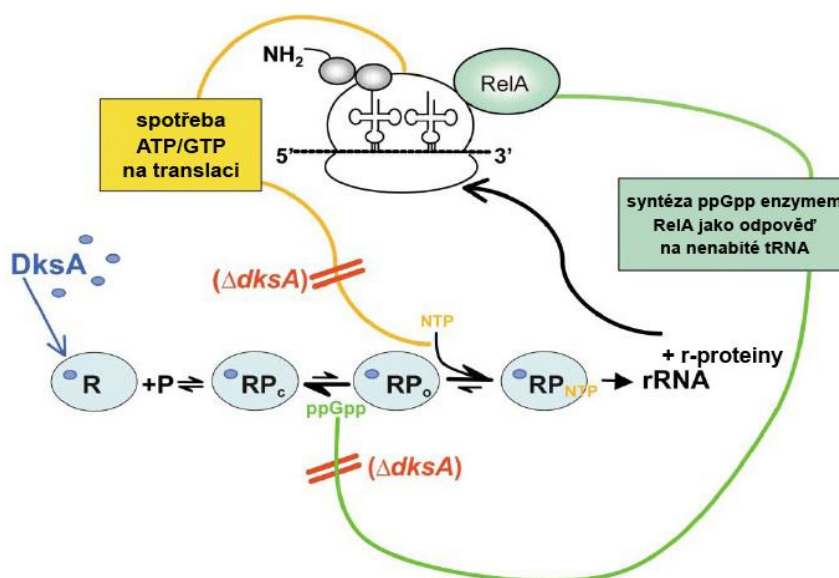
Při nedostatku aminokyselin vhodných k zařazení do nově vznikajícího proteinu, tedy při zařazení nenabitě tRNA do A místa ribozomu, začne enzym RelA asociovaný s ribozomem katalyzovat přeměnu GTP nebo GDP na (p)ppGpp s použitím ATP. Druhý enzym, který může syntetizovat ppGpp, je SpoT. Ten může ppGpp jak syntetizovat, tak zpět hydrolyzovat na GDP nebo GTP a pyrofosfát. Syntéza enzymem SpoT je zahajována ne při hladovění aminokyselinovém, ale při nedostatku fosforu, železa, zdroje uhlíku nebo mastných kyselin (Srivatsan and Wang, 2008).

Alarmon ppGpp pak spouští v rámci stringentní odpovědi buňky kaskády vedoucí k aktivaci proteáz, drah syntetizujících aminokyseliny z lipidů a nukleotidů a celkově inhibuje syntézu, slouží totiž jako specifický inhibitor promotorů pro rRNA a většinu tRNA a také pro některé mRNA promotory, např. pro ribozomální proteiny (Lemke et al., 2011). Ke svému správnému fungování potřebuje ještě kofaktor, protein DksA (viz 5.1.3).

Regulace syntézy rRNA je důležitým cílem molekuly ppGpp. Promotory pro rRNA obsahují totiž tzv. diskriminátor bohatý na GC a promotory tohoto typu vytvářejí v průběhu transkripce velmi nestabilní otevřené komplexy s RNAP. Stabilita otevřeného komplexu (doba jeho trvání) je limitujícím krokem pro transkripci z těchto promotorů. ppGpp a DksA pak ještě dál snižují

stabilitu tohoto komplexu a tak inhibují rRNA transkripci. (Protein DksA nastavuje v buňce senzitivitu vůči ppGpp.) Opačně se děje u promotorů pro biosyntézu aminokyselin, kde je diskriminátor bohatý na AT, což je optimální pro vazbu oblasti 1.2 podjednotky σ RNAP. ppGpp také destabilizuje trvání RP_o , ale zároveň urychluje izomerizaci, tedy přeměnu komplexu RNAP:promotor v jinou jeho formu a tak zvyšuje šanci přepisu RNA z těchto promotorů (Haugen et al., 2008; Srivatsan and Wang, 2008).

Iniciační nukleosidtrifosfáty, **iNTP**, svou vazbou na RNAP a templátové vlákno DNA stabilizují rRNA promotorové komplexy. Šest ze sedmi ribozomálních promotorů *rrn* u *E. coli* požadují jako iNTP ATP a jeden operon GTP (Gaal et al., 1997). U *B. subtilis* je jediným iNTP GTP (Krasny and Gourse, 2004). Dále je u *B. subtilis* důležitá identita +1 místa (Krasny et al., 2008; Turnbough, Jr., 2008), kdy záleží, zda transkript iniciuje ATP nebo GTP. V buňce totiž např. při stringentní odpovědi dojde k současnému nárůstu koncentrace ATP a poklesu koncentrace GTP. U promotorů citlivých na koncentraci iNTP pak identita +1 pozice určuje, zda v takové situaci aktivita promotoru stoupá či klesá.



Obrázek 5: Znázornění působení ppGpp, iNTP a DksA na komplex RNAP:promotor.

DksA (modré oválky, více viz 5.1.3) se váže na RNAP, snižuje životnost otevřeného komplexu RNAP:promotor, a nastavuje citlivost na koncentraci iNTP (žlutě) nutných k iniciaci a i na koncentraci ppGpp (zeleně). Promotory pro rRNA jsou citlivé na změny koncentrace iNTP a ppGpp. Pokud je koncentrace iNTP vysoká, přepisuje se hodně rRNA, a tak se spotřebovává ATP a GTP na translaci. Spotřebování NTP na translaci sníží hladinu iNTP v buňce a tak se zpomalí i syntéza rRNA. Množství ppGpp je regulováno rychlostí syntézy proteinem RelA jako odpověď na nenabitě tRNA v A místě ribozomu, které vzniknou nedostatkem aminokyselin v buňce. ppGpp pak inhibuje syntézu rRNA.

V mutantech pro gen *dksA* (červeně) jsou komplexy RNAP:promotor stabilní a otevřené pro iniciaci transkripce déle, což je činí necitlivými (červené dvojité lomítko) k změnám hladin iNTP a ppGpp. (Paul et al., 2004)

4.2 Regulace transkripčními faktory

U *E.coli* bylo celkově popsáno asi 300 transkripčních faktorů (TF) a odhaduje se, že sedm z nich (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL a Lrp) kontroluje expresi asi 50% všech genů. Druhým extrémem je pak to, že u pětiny TF ovlivňuje každý faktor maximálně dva promotory (Martinez-Antonio and Collado-Vides, 2003).

U *E. coli* jsou TF obvykle označovány třípísmennou zkratkou, popisující jejich funkci. Čtvrté písmeno pak označuje specifický produkt tohoto genu tam, kde je transkripčních faktorů se stejnou funkcí vícero (Browning and Busby, 2004). Nejznámějším faktorem je CRP, cAMP receptorový protein.

I sama funkce transkripčních faktorů musí být regulována a děje se tak vícero odlišnými způsoby. Za prvé, afinita TF k DNA může být měněna malými ligandy. Koncentrace těchto ligandů kolísá v závislosti na nutričním stavu buňky a stresu. Druhý způsob je změna aktivity TF pomocí kovalentních modifikací (například NarL, regulátor nitrátového dýchání, se může vázat na svou cílovou DNA pouze ve fosforylovaném stavu). Třetí varianta regulace je sama koncentrace TF v buňce, která rozhoduje, zda bude spuštěna další transkripce či naopak proteolýza. Poslední možnost je interakce TF s regulačním proteinem, který vyváží volný TF z buňky (Browning and Busby, 2004; Grainger and Busby, 2008).

TF můžeme rozdělit podle různých kritérií; podle:

- **efektu na genovou expresi**

TF mohou mít na transkripci dvojí účinek. Stimulační, pak se nazývají aktivátory, a účinek opačný – transkripci blokuje – a nazývají se represory. Mnoho aktivátorů stimuluje vazbu RNAP k specifickému promotoru díky přímé protein-protein interakci, jako například CRP. Represory naopak obsazují promotory pro RNAP nebo činí komplex RNAP:promotor neaktivním. Příkladem represoru je CodY u *B. subtilis* (Sonenshein, 2005).

- **šíře účinku**

Malé množství TF, nazývaných globální regulátory, ovlivňuje produkci velkého množství genů. Naopak velké množství specifických regulátorů účinkuje pouze na velmi úzký výběr genů. (Grainger and Busby, 2008)

- **třídy aktivace promotoru**

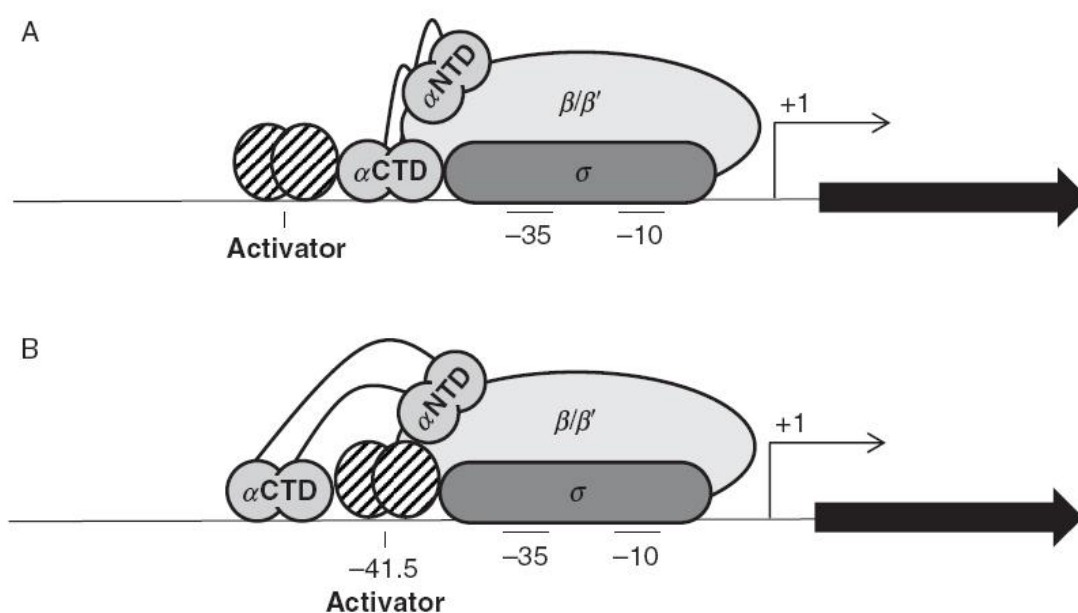
Promotory se podle typu interakce s aktivátory (TF) dělí do tří skupin:

Třída I. V tomto případě se aktivátor váže před promotor proti směru transkripce a zároveň na C-koncovou doménu podjednotky α RNAP. (viz obrázek 6A) Typickým příkladem je vazba CRP na promotor *lac*. Spojka mezi C-koncovou doménou a N-koncovou doménou

podjednotky α je velmi pružná, takže různé aktivátory spadající do třídy I., se mohou vázat na různá místa před promotorem.

Třída II. Aktivace promotoru tohoto typu zahrnuje vazbu aktivátoru na místo na DNA, jež je přilehlé promotorové sekvenci -35 a dále přímou vazbu na RNAP, konkrétněji na doménu 4 podjednotky σ . (obrázek 6B) Ve většině případů je k vazbě na doménu 4 podjednotky σ ⁷⁰ nutná vazba aktivátoru na nebo do blízkosti pozice -41,5. Jako příklad slouží aktivace promotoru PRM bakteriofága λ jeho proteinem CI.

Třída III. Do této kategorie spadají aktivátory, které se mohou vázat oběma výše uvedenými způsoby a tak navádět RNAP na promotor různě v odlišných stresových podmínkách v buňce. (Browning and Busby, 2004)



Obrázek 6: Třída I. a třída II. aktivace promotoru.

A: Aktivace třídy I. Aktivátor (šrafovaně) se váže před promotor (proti směru transkripce) a navazuje C-koncovou doménu podjednotky α .

B: Aktivace třídy II. Aktivátor se navazuje přímo k sekvenci -35 proti směru transkripce a může interagovat se všemi podjednotkami RNAP, hlavně s doménou 4 podjednotky σ . (Grainger and Busby, 2008).

- **místa interakce s RNAP**

TF se mohou vázat na různá místa RNAP. Například NusA se váže do blízkosti kanálu, kudy vystupuje nově vzniklá RNA (Yang et al., 2009), TRCF poblíž primárního kanálu, který váže DNA (Borukhov et al., 2005), GreA, GreB, DksA, iNTP přímo do sekundárního kanálu (Haugen et al., 2008)

- **fáze transkripce, ve které působí**

Takto lze faktory rozdělit na iniciační, elongační a terminační.

Iniciační faktory jsou převážně ty, co se vážou přímo na RNAP či ovlivňují její rozeznávání promotorové sekvence.

Elongační a terminační faktory známé u *E. coli* jsou faktory Nus, RfaH, ribosomální S4 protein, faktory Gre, Mfd (TRCF), RapA (HepA) a Rho. Způsobují předčasné ukončení transkripce zastavením transkripčního komplexu, signálem k pauzám, transkripčními překážkami (Borukhov et al., 2005).

- **typu interakce**

TF můžeme rozdělit i na základě toho, zda se vážou jen na RNAP, nebo zprostředkovávají kontakt promotorové DNA s RNAP, nebo interagují s RNA a RNAP.

Přehled transkripčních faktorů podle tohoto rozdělení je obsahem kapitoly 5.

5 Transkripční faktory interagující s RNAP

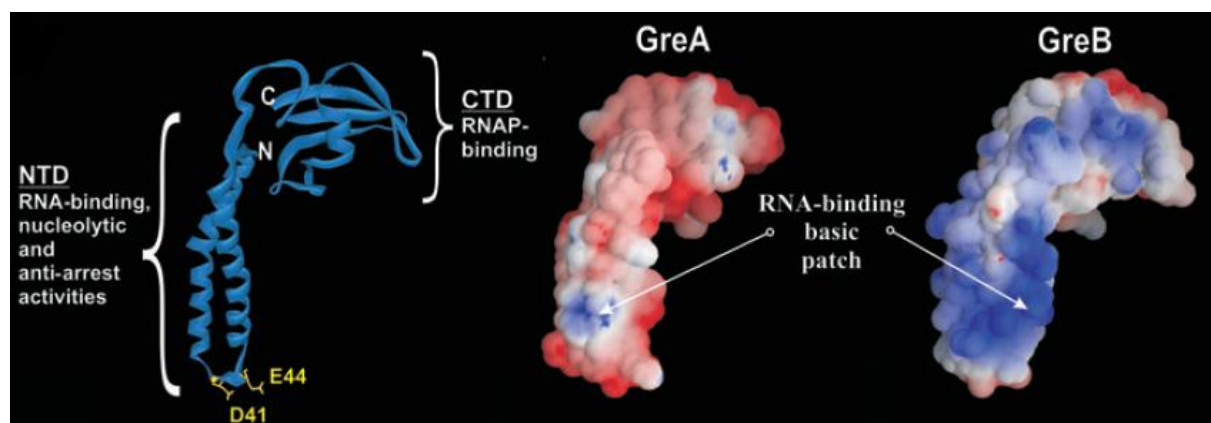
5.1 Faktory interagující pouze s RNAP

5.1.1 Faktory Gre (GreA, GreB)

Faktory Gre jsou malé (přibližně 160 AK dlouhé) homologní elongační proteiny, které se váží do sekundárního kanálu RNAP. U *E. coli* známe dva, GreA a GreB. Potlačují pozastavení RNAP a zastavení transkripce *in vitro* i *in vivo* stimulací nukleolytické aktivity RNAP (Borukhov et al., 2005).

Když RNAP při elongaci narazí na překážku, zastaví se a při tom může dojít k jejímu posunu zpět po vlákně DNA. Vznikající 3'konec RNA se tak dostane mimo aktivní místo do sekundárního kanálu. Faktory Gre indukují štěpení této RNA pomocí RNAP a tak se vytvoří nový 3'konec, který umožní RNAP pokračovat v transkripci dokončit elongaci. GreA odštěpuje hlavně di- a trinukleotidy, GreB dokonce fragmenty až 18 nt dlouhé. (Rutherford et al., 2007)

Faktory Gre se skládají ze dvou strukturních domén, N-koncové *coiled-coil* a C-koncové globulární, které jsou znázorněny na obrázku 7. N-koncová doména je zodpovědná za nukleolytickou a *anti-arrest* aktivitu, a díky svému pozitivně nabitému povrchu může interagovat i s vznikající RNA v elongačním komplexu (Koulich et al., 1997). Na svém povrchu má totiž dva konzervované kyselé aminokyselinové zbytky, D41 a E44, aspartát a glutamát, které vystavuje do sekundárního kanálu a které tam interagují s Mg^{2+} a molekulou vody, které je nutná pro katalýzu hydrolýzy (Laptenko et al., 2003). C-koncová doména zprostředkovává vazbu na RNAP, na podjednotku β' do blízkosti sekundárního kanálu.



Obrázek 7: Struktura proteinů Gre.

Vlevo – Stuhový model proteinu GreA u *E. coli*. Dva důležité aminokyselinové zbytky, D41 a E44, jsou označeny žlutě.

Uprostřed a vpravo – Model, znázorňující rozdělení elektrostatického potenciálu na povrchu proteinů GreA a GreB. Bílou barvou je povrch nenabitý, červeně se záporným nábojem (Asp, Glu) a modře s nábojem kladným (Arg, Lys). (Borukhov et al., 2005)

5.1.2 Rnk a Gfh 1

Tyto dva proteiny, Rnk a Gfh1, jsou strukturně velmi podobné faktorům Gre, hlavně sdílejí velmi podobnou C-koncovou doménu.

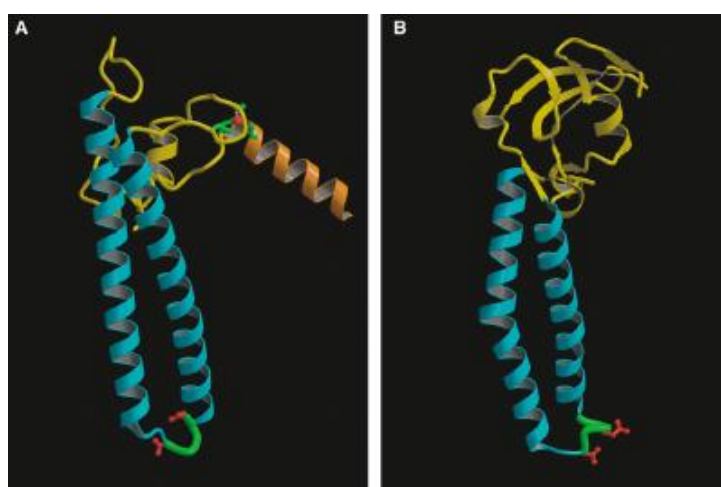
Rnk je kináza podobná faktorům Gre, ale má mnohem kratší N-koncovou *coiled-coil* doménu. Nemá nukleolytickou aktivitu ani nesnižuje životnost RP_0 . Díky velmi podobné C-koncové doméně soutěží s faktory Gre o stejné vazebné místo na RNAP a tak pravděpodobně může sloužit i jako anti-Gre faktor (Lamour et al., 2008). Anti-Gre faktory jsou proteiny, které kompetují s faktory Gre o vazbu na efektivním místě a tak znemožňují projevení jejich účinku.

Jiný homolog faktorů Gre a anti-Gre faktor, **Gfh 1**, lze najít v *Thermus thermophilus*. Gfh 1 znemožňuje nukleolytickou aktivitu na transkriptu a soutěží s faktory Gre o vazebné místo na RNAP. (Symersky et al., 2006)

5.1.3 DksA

Transkripční faktor DksA, molekulové hmotnosti 17,5 kDa, hraje důležitou roli při stringentní odpovědi v regulaci genové exprese hlavně rRNA a genů pro biosyntézu AK. DksA zesiluje signál vytvářený malými molekulami, iNTP a ppGpp (podkapitola 4.1, obrázek 5) tím, že nastavuje citlivost RNAP vůči těmto molekulám. Navíc hraje roli v procesech zahrnujících rozchod chromozomů při buněčném dělení, opravu DNA, správné sbalování proteinů, bakteriální pohyblivost, virulenci, vnímání hustoty bakterií v populaci a expresi fimbrií typu 1. (Blankschien et al., 2009) Delece či nadexprese tohoto genu mají na bakterie pleiotropní účinek. (Paul et al., 2004)

Strukturně je DksA podobný proteinům Gre svým členěním na dvě domény. Dlouhý *coiled-coil* N-konec se dvěma aspartátovými zbytky a C-koncovou globulární doménou, která na rozdíl od Gre obsahuje motiv Zn^{+2} prstů. Sekvenční homologie ovšem mezi těmito proteiny nebyla nalezena (Rutherford et al., 2007). Porovnání je vidět na obrázku 8.



Obrázek 8: Struktura DksA (A) a GreA (B) (Perederina et al., 2004)

5.1.4 TraR

TraR je strukturním homologem DksA, sdílí C-koncovou doménu s motivem Zn^{+2} prstů a ovlivňuje genovou expresi stejně jako DksA, ale nepotřebuje k tomu ppGpp. Produkce TraR kompenzuje u mutantů na *dksA* represi transkripce. Jeho působení je inhibováno GreB, faktorem, které se váže do sekundárního kanálu RNAP, z čehož lze usuzovat, že se bude TraR vázat tamtéž, stejně jako DksA. (Blankschien et al., 2009)

5.1.5 RapA (HepA)

RapA označuje bakteriální homolog eukaryotického proteinu SWI2/SNF2. Ten patří do nadrodiny SWI/SNF, kam spadají proteiny podobné helikázám. Sdílejí šest evolučně konzervovaných domén a uplatňují se v remodelování chromatinu či nukleozómu a genové expresi u eukaryotických organismů.

Protein RapA, nalezený u *E. coli*, dosahuje velikosti 110 kDa a váže se jak na RNAP, tak na RNAP ve formě holoenzymu. Větší afinitu vykazuje k jádru RNAP, konkrétně se váže na povrch podjednotek α a β' (Sukhodolets and Jin, 2000). Je znám také jako protein HepA (Muzzin et al., 1998). Stejně jako proteiny z rodiny SWI/SNF vykazuje ATPázovou aktivitu, která se projevuje jen ve vazbě na RNAP (Sukhodolets et al., 2001).

RapA je zodpovědný za aktivaci transkripce, napomáhá RNA syntéze. Jeho funkce závisí na sbalení DNA (*supercoiled*) a vysoké koncentraci solí, tedy na podmínkách, které nastávají, pokud je DNA ve formě nadšroubovicové pevně sbalena (Sukhodolets et al., 2001). RNAP při vysoké koncentraci solí bez přítomnosti RapA nefunguje. RapA využívá energii z hydrolyzy ATP k usnadnění úniku RNAP po zastavení na DNA a aktivuje transkripci pomocí stimulace recyklace RNAP molekul.

5.1.6 TRCF a CarD

TRCF, *transcription – repair coupling factor*, produkt genu *mfd*, je elongační faktor, který se zúčastní oprav chyb na DNA způsobených v průběhu transkripce. Reaktivuje zastavené molekuly RNAP a obnovuje elongační fázi. Je to evolučně konzervovaný protein o velikosti 130 kDa, strukturně podobný DNA helikáze. Váže se na podjednotku β RNAP, k primárnímu (DNA vazebnému) kanálu. (Borukhov et al., 2005)

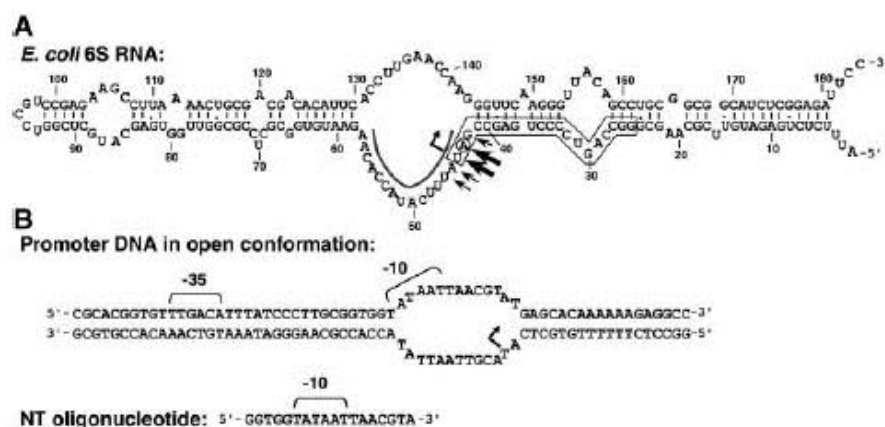
Když se v průběhu transkripce vyskytne poškozené místo na DNA, RNAP se zastaví a započne proces zvaný jako TRC, oprava chyb způsobených při transkripci. Ovšem zastavená molekula RNAP na DNA překáží zahájení oprav, proto je potřeba další faktor, TRCF. Ten zastavenou RNAP díky své DNA translokázové aktivitě závislé na ATP odstraní a pak opravu DNA nastartuje navázáním komplexu endonukleáz UvrA₂B. (Westblade et al., 2010)

C-konec TRCF obsahuje sedm konzervovaných helikázových motivů, translokázový motiv TRG a C-koncovou doménu, která se může podílet na vazbě na RNAP a její uvolnění. N-konec

CarD, homolog TRCF, znám také jako CdnL, je protein získaný z *Mycobacterie tuberculosis*, kde kontroluje transkripci rRNA. Je přepisován jako odpověď na buněčný stres a hraje klíčovou roli v perzistenci a patogenezi (Stallings et al., 2009). Delece tohoto genu vede ke zvýšené citlivosti až zabíjení buněk oxidačním stresem, hladověním, poničením DNA. Zároveň se tato delece projevuje neschopností snížit transkripci rRNA. CarD může funkčně nahradit DksA v jeho stringentní odpovědi (více 5.1.3), ačkoli se oba faktory vážou na jiné místo na RNAP. Jak přesně CarD působí na RNAP není známo.

Jako transkripční regulační faktor, i když odlišný od výše zmíněných, působí i nekódující malá 6S RNA.

Primární sekvence 6S RNA není úplně konzervována, ale sekundární struktura ano. 6S RNA vytváří vlásenku z dvouvláknové RNA s jednovláknovou centrální bublinou (Panek et al., 2010). Imituje tak svou sekundární strukturou otevřený komplex (viz obrázek 9) vznikající na DNA v průběhu iniciace transkripce, na který pak nasedá RNAP a zahajuje přepis genetické informace. Vazba 6S RNA do aktivního místa RNAP tedy vylučuje vazbu polymerázy na promotor. (Wassarman, 2007)



B: Sekvence DNA promotoru v otevřené konformaci a netemplátový (NT) oligonukleotid. (Wassarman and Saecker, 2006)

6S RNA se v buňce objevuje jako odpověď na hladovění, kdy je potřeba přeprogramovat genovou expresi. 6S RNA vyvazuje holoenzym $E\sigma^{70}$ a umožňuje tak spouštění exprese z promotorů závislých na jiných faktorech σ . (V pozdní stacionární fázi dosahuje 6S RNA počtu cca 10 000 kopií na buňku. Během exponenciální a stacionární fáze je 90% 6S RNA v buňce ve vazbě s $E\sigma^{70}$, v pozdní stacionární fázi, kdy je v buňce 6S RNA nejvíc, je většina $E\sigma^{70}$ v komplexu s 6S RNA (Wassarman and Storz, 2000).)

Když má naopak buňka dostatek živin, hlavně aminokyselin, dokáže se RNAP z vazby s 6S RNA uvolnit. Po rychlém nárůstu koncentrace NTP se RNAP uvolní tak, že použije 6S RNA jako templát pro RNA syntézu. Po vytvoření 14-20 nukleotidů dlouhého oligonukleotidu (pRNA) se komplex 6S RNA:RNAP stane nestabilním a RNAP může uniknout (Wassarman and Saecker, 2006).

5.2 Faktory interagující s DNA a RNAP

5.2.1 Faktory Nus (NusA, NusB, NusG a NusE)

Rodina faktorů Nus patří mezi evolučně konzervované elongační faktory, které spolu vytvářejí komplexy a tak násobí/kombinují své funkce. Komplex NusA s NusG, NusB a NusE podporuje pročení se přes ribozomální operon *rrn* a nebo například i přes chromozom bakteriofágu λ (v komplexu s dalšími proteiny N a Q bakteriofágu vlastních). (Borukhov et al., 2005)

NusA je esenciální multifunkční transkripční elongační faktor, který se váže do okolí primárního kanálu a kanálu, kudy RNAP opouští nově nasyntetizovaná RNA. Má důležité regulační role v anti-terminaci a pauzingu, vyvolaném *his*- a *trp*- vlásečkami (Borukhov et al., 2005), terminaci nezávislé na Rho a v potlačení toxických genů u *E. coli* (Yang et al., 2009).

Strukturní podobnost N-koncové domény NusA a oblasti 2 podjednotky σ^{70} naznačuje, že oba tyto proteiny soutěží o vazbu na stejné místo, zvané β -flap, na RNAP (Borukhov et al., 2005). Nicméně z dalších výsledků vyplynulo, že se na RNAP mohou tyto proteiny vázat i současně (Yang et al., 2009). β -flap hraje roli ve vytvoření komplexu promotor:RNAP, konkrétně promotoru s oblastí 4 podjednotky σ , stejně jako navazuje kontakt s vznikající RNA během elongace a terminace transkripce.

NusG, opět vysoce konzervovaný protein o hmotnosti 21 kDa, aktivuje terminaci transkripce závislou na Rho. Potlačuje pauzing RNAP, zvyšuje rychlost uvolnění RNA z transkripčního elongačního komplexu, prodlužuje délku RNA transkriptu (Burmam et al., 2010). Je esenciální a hojný u *E. coli*; u *B. subtilis* neesenciální.

NusG je dvou doménový protein, jehož struktura je znázorněna na obrázku 10C. Svou C-koncovou doménou může vytvářet komplex buď s proteinem Rho, nebo s transkripčním faktorem **NusE**, známým také jako 30S ribosomální protein S10. N-koncová doména NusG pak interaguje s RNAP.

NusG kooperuje s NusA, NusB, NusE a dalšími faktory, vytváří specializované anti-terminační komplexy, které jsou odolné vůči signálům pauz a terminaci transkripce. (Belogurov et al., 2010)

Komplex dvou faktorů NusE:NusG spojuje u *E. coli* transkripci s translací. Spojení transkripce s translací bylo objeveno díky atenuačnímu systému, který kontroluje expresi z operonů pro biosyntézu aminokyselin. Během tohoto spřažení je C-terminální doména NusG navázána na ribozomální protein NusE a tak je znemožněna vazba Rho tamtéž. Uvolnění ribozomu z mRNA po pročtení se na konec operonu uvolní C-terminální doména a tak se na ni může navázat Rho. (Burmam et al., 2010)

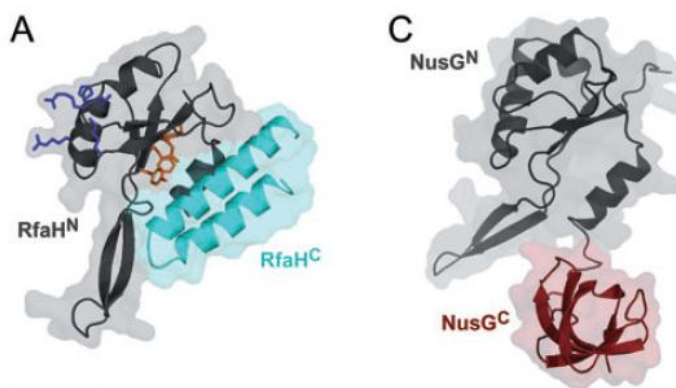
U **NusB** a **NusE** je známá jen jejich role v komplexu s ostatními faktory v anti-terminačním elongačním komplexu. NusB je první faktor, který se navazuje. Tento komplex se váže na vznikající rRNA. NusE pak vytváří heterodimer s NusB a tím stabilizuje komplex NusB:NusE:RNA, což umožní se navázat ostatním faktorům, NusA a NusG. (Lewis et al., 2008)

5.2.2 RfaH

RfaH označuje bakteriální elongační faktor, který zvyšuje transkripci z určitých promotorů. Je paralogem výše zmíněného faktoru NusG. Ale na rozdíl od něj není RfaH závislý na dalších faktorech a kontaktuje pouze ty operony, které obsahují ve své nepřekládané vůdčí sekvenci 12 nt dlouhý specifický element *ops* (*operon polarity suppressor*, element potlačující polaritu operonu) (Belogurov et al., 2009). Element *ops* způsobuje pauzování RNAP a je nutný k navázání RfaH na RNAP.

RfaH a NusG se váží na stejné místo na RNAP, prodlužují délku transkriptu a potlačují pauzování RNAP. RfaH potlačuje pauzování i u terminačních vlásenek (u terminace nezávislé na Rho), působí tedy jako anti-terminační faktor. U terminace na Rho závislé inhibuje funkci Rho proteinu a naopak aktivuje produkci genů pro virulenci, například genů pro biosyntézu LPS, kapsidy, hemolyzinu a jiných (Belogurov et al., 2009). (NusG naopak u Rho-terminace zvyšuje její účinnost (Belogurov et al., 2010).)

To, že se tyto dva proteiny někdy ve své funkci shodují a v jiné mají účinek naprosto opačný, je dáno i jejich strukturou. Oba faktory se skládají ze dvou domén, kde jsou si N-koncové domény velmi podobné, zatímco C-koncové domény jsou naprosto odlišné, jak je vidět na obrázku 10.



Obrázek 10: Struktura elongačního faktoru NusG (C) a jeho paralogu RfaH (A).

A – model RfaH u *E. coli*. N-koncová doména (RfaH^N) je znázorněna šedě a C-koncová doména (RfaH^C) bledě modře. Zbytky aromatických aminokyselin na povrchu proteinu jsou vyvedeny v oranžové a zbytky polárních aminokyselin v tmavě modré.

C – model NusG u *E. coli*. C-koncová doména odlišná od RfaH (NusG^C) je vybarvena tmavě červeně (Belogurov et al., 2010).

5.2.3 Fis

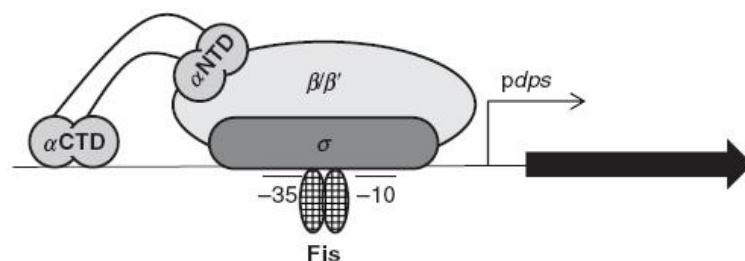
Fis (*factor for inversion stimulation*) je 11,2 kDa velký protein, který vytváří homodimer. Hraje roli v aktivaci transkripce stabilizací RNA promotorů, inverzí DNA, vyštěpení fágu λ z genomu a iniciaci replikace DNA z *oriC* (Bokal et al., 1995).

Váže se na promotorovou DNA jako aktivátor třídy I. svým *helix-turn-helix* motivem na konci C-koncového oblasti. Je tomu tak v případě ribosomálních promotorů u *E. coli*, *rrnB* a *rrnE*, a napomáhá vazbě RNAP na promotor interakcí s její α CTD (Paul et al., 2004; Aiyar et al., 2002).

U promotoru *proP* P2 funguje jako aktivátor třídy II. *ProP* promotor u *E. coli* spouští transkripci genů pro integrální membránový transportér například prolinu a jiných sloučenin, které regulují osmotické gradienty buňky (McLeod et al., 2002).

Fis však nemusí vždy působit jako aktivátor, je známa i jeho reprimující funkce v případě *dps* promotoru, kdy se váže do centra promotoru a znehybní na něm nasednuvší RNAP (obrázek 11) a znemožní tak vytvoření otevřeného komplexu. Zajímavostí je, že *dps* promotor je rozpoznáván jak $E\sigma^{70}$, tak $E\sigma^{38}$, ale Fis má tlumivý účinek jen na RNAP s σ^{70} . (Grainger and Busby, 2008)

Fis patří také do skupiny nukleoid-asociovaných proteinů, které pomáhají chromozomu se správně sbalit. Tyto proteiny se váží na DNA (s menší specifitou než FNR a CRP) a způsobují ohýbání DNA. Tento ohyb pak může být důležitý pro kontakt Fis a RNAP. (Bokal et al., 1995)



Obrázek 11: Potlačení tvorby otevřeného komplexu na promotoru *dps* faktorem Fis
(Grainger and Busby, 2008)

5.3 Faktory interagující s RNA a RNAP

5.3.1 Rho

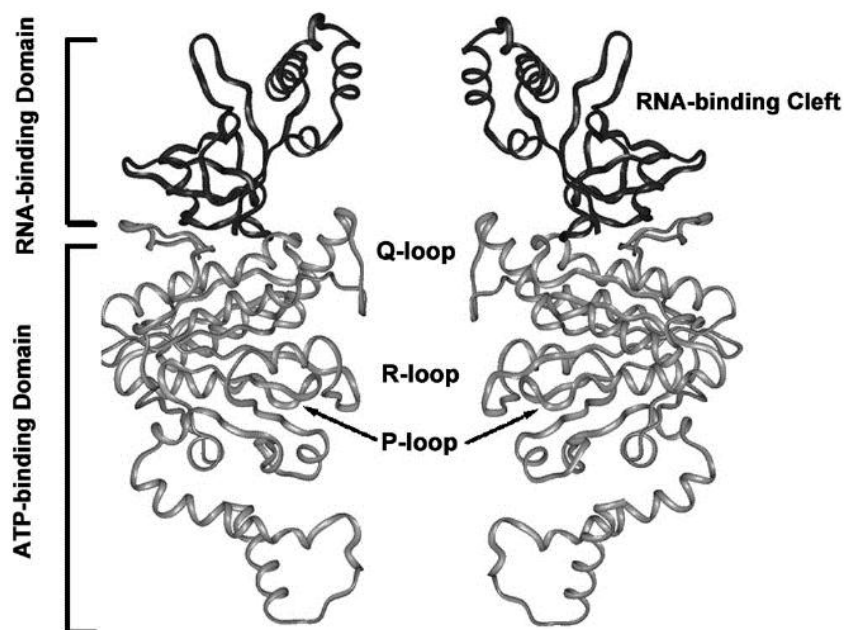
Protein Rho je znám především pro svou souvislost s terminací transkripce. Skládá se z šesti 46 kDa podjednotek uspořádaných do prstencové struktury a má ATPázovou aktivitu závislou na RNA a aktivitu helikázovou. Jeho specifický inhibitor je BCM, bicyklomycin, který právě tuto aktivitu blokuje (Peters et al., 2009).

Každá z šesti podjednotek se skládá z N-koncové domény, která váže RNA, a C-koncové domény, která umožňuje navázání ATP. Struktura dvou podjednotek je znázorněna na obrázku 12 níže.

Po vazbě na vznikající RNA se Rho přemisťuje díky hydrolyze ATP po RNA ve směru $5' \rightarrow 3'$, dokud nenarazí na elongační komplex s RNAP. Pak umožní uvolnění transkriptu a rozpad elongačního komplexu. Je i schopen vazby na RNAP (konkrétně na podjednotky β a β') bez předchozího kontaktu s RNA, ale schopnost terminace transkripce je pak nižší (Epshtein et al., 2010). Přednostně se Rho váže na jednovláknovou RNA s vysokým obsahem C. Na nově vznikající mRNA je ihned zahájena translace, vlákno RNA je tedy obsazeno ribozomy a Rho se nemůže vázat, dokud se ribozomy nepročtou ke konci operonu. Ale jakmile se odpojí a RNA je volná, nasedne na ni Rho a započne terminaci. (Richardson, 2002)

Příkladem může být regulace translace operonu *trp*. Když je v buňce nedostatek AK vhodných k zařazení na nově vznikající transkript, RNAP pauzuje, zvyšuje se tak mezera mezi RNAP a ribozomem, může se tedy navázat Rho, který ve výsledku způsobí disociaci RNAP z DNA a konec transkripce.

Aktivitu Rho ovlivňují transkripční faktory NusA a NusG (oddíl 5.2.1). NusG aktivuje terminaci transkripce závislou na Rho (Pasman and von Hippel, 2000), ale NusA naopak hraje zásadní roli při terminaci nezávislé na Rho, a to tak, že soutěží s Rho o vazbu na RNA, která by vedla k terminaci (Ciampi, 2006).



Obrázek 12: Struktura dvou protilehlých podjednotek Rho hexameru.

Podjednotky jsou znázorněny s osovou souměrností podél osy svislé s rovinou papíru. N-koncová doména každé podjednotky je znázorněna černou barvou, C-koncové domény jsou šedé. Z obrázku je patrná struktura ATP a RNA vazebných domén. (Richardson, 2002)

6 Závěr

Transkripčních faktorů, které ovlivňují funkci RNA polymerázy, je velmi mnoho. Je to dáno tím, že RNAP je klíčovým enzymem na počátku transkripční fáze genové exprese, a tak změny její funkce ovlivní zásadním způsobem celou genovou expresi.

Každý transkripční faktor může mít vícero účinků či se mohou účinky jednotlivých TF ovlivňovat. Za faktory působící na transkripci můžeme považovat mnoho molekul a ani výčet uvedený v této práci jistě není definitivní a kompletní.

V laboratoři Molekulární genetiky bakterií, kde jsem vypracovala tuto bakalářskou práci, byla v současnosti objevena nová helikáza v modelovém organismu *B. subtilis*, kódovaná genem *yvgS*. Velmi pravděpodobně interaguje s RNAP. Ze sekvenční analýzy pak vyplývá, že YvgS není homologem helikázy RapA, popsané u *E. coli*. Přesné místo interakce této nové helikázy YvgS s RNAP není ještě popsáno. Rovněž není jasná její role v transkripci. Tyto otázky budou předmětem mé diplomové práce.

7 Seznam použité literatury

- Aiyar, S.E., McLeod, S.M., Ross, W., Hirvonen, C.A., Thomas, M.S., Johnson, R.C., and Gourse, R.L. (2002). Architecture of Fis-activated transcription complexes at the *Escherichia coli* rrnB P1 and rrnE P1 promoters. *J. Mol. Biol.* 316, 501-516.
- Belogurov, G.A., Mooney, R.A., Svetlov, V., Landick, R., and Artsimovitch, I. (2009). Functional specialization of transcription elongation factors. *EMBO J.* 28, 112-122.
- Belogurov, G.A., Sevostyanova, A., Svetlov, V., and Artsimovitch, I. (2010). Functional regions of the N-terminal domain of the antiterminator RfaH. *Mol. Microbiol.* 76, 286-301.
- Blankschien, M.D., Potrykus, K., Grace, E., Choudhary, A., Vinella, D., Cashel, M., and Herman, C. (2009). TraR, a homolog of a RNAP secondary channel interactor, modulates transcription. *PLoS. Genet.* 5, e1000345.
- Bokal, A.J., Ross, W., and Gourse, R.L. (1995). The transcriptional activator protein FIS: DNA interactions and cooperative interactions with RNA polymerase at the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter. *J. Mol. Biol.* 245, 197-207.
- Borukhov, S., Lee, J., and Laptenko, O. (2005). Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Mol. Microbiol.* 55, 1315-1324.
- Browning, D.F. and Busby, S.J. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 57-65.
- Brownlee, G.G. (1971). Sequence of 6S RNA of *E. coli*. *Nat. New Biol.* 229, 147-149.
- Burgess, R.R. (1969). Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 244, 6168-6176.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., and Bautz, E.K.F. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221, 43-46.
- Burmann, B.M., Schweimer, K., Luo, X., Wahl, M.C., Stitt, B.L., Gottesman, M.E., and Rosch, P. (2010). A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* 328, 501-504.
- Ciampi, M.S. (2006). Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* 152, 2515-2528.
- Dehaseth, P.L., Zupancic, M.L., and Record, M.T., Jr. (1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 180, 3019-3025.
- Epshtein, V., Dutta, D., Wade, J., and Nudler, E. (2010). An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature* 463, 245-249.
- Gaal, T., Bartlett, M.S., Ross, W., Turnbough, C.L., Jr., and Gourse, R.L. (1997). Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science* 278, 2092-2097.
- Grainger, D.C. and Busby, S.J. (2008). Global regulators of transcription in *Escherichia coli*: mechanisms of action and methods for study. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 93-113.
- Grundy, F.J. and Henkin, T.M. (2004). Regulation of gene expression by effectors that bind to RNA. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 126-131.

- Haugen,S.P., Ross,W., and Gourse,R.L. (2008). Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 507-519.
- Hughes,K.T. and Mathee,K. (1998). The anti-sigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 231-286.
- Hurwitz,J. (2005). The discovery of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 280, 42477-42485.
- Koulitch,D., Orlova,M., Malhotra,A., Sali,A., Darst,S.A., and Borukhov,S. (1997). Domain organization of Escherichia coli transcript cleavage factors GreA and GreB. *J. Biol. Chem.* 272, 7201-7210.
- Krasny,L. and Gourse,R.L. (2004). An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: Bacillus subtilis rRNA transcription regulation. *EMBO J.* 23, 4473-4483.
- Krasny,L., Tiserova,H., Jonak,J., Rejman,D., and Sanderova,H. (2008). The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* 69, 42-54.
- Lamour,V., Rutherford,S.T., Kuznedelov,K., Ramagopal,U.A., Gourse,R.L., Severinov,K., and Darst,S.A. (2008). Crystal structure of Escherichia coli Rnk, a new RNA polymerase-interacting protein. *J. Mol. Biol.* 383, 367-379.
- Lampe,M., Binnie,C., Schmidt,R., and Losick,R. (1988). Cloned gene encoding the delta subunit of Bacillus subtilis RNA polymerase. *Gene* 67, 13-19.
- Laptenko,O., Lee,J., Lomakin,I., and Borukhov,S. (2003). Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. *EMBO J.* 22, 6322-6334.
- Lemke,J.J., Sanchez-Vazquez,P., Burgos,H.L., Hedberg,G., Ross,W., and Gourse,R.L. (2011). Direct regulation of Escherichia coli ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 5712-5717.
- Lewis,P.J., Doherty,G.P., and Clarke,J. (2008). Transcription factor dynamics. *Microbiology* 154, 1837-1844.
- Liu,C., Heath,L.S., and Turnbough,C.L., Jr. (1994). Regulation of pyrBI operon expression in Escherichia coli by UTP-sensitive reiterative RNA synthesis during transcriptional initiation. *Genes Dev.* 8, 2904-2912.
- MacLellan,S.R., Guariglia-Oropeza,V., Gaballa,A., and Helmann,J.D. (2009). A two-subunit bacterial sigma-factor activates transcription in Bacillus subtilis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 21323-21328.
- Martinez-Antonio,A. and Collado-Vides,J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 482-489.
- McLeod,S.M., Aiyar,S.E., Gourse,R.L., and Johnson,R.C. (2002). The C-terminal domains of the RNA polymerase alpha subunits: contact site with Fis and localization during co-activation with CRP at the Escherichia coli proP P2 promoter. *J. Mol. Biol.* 316, 517-529.
- Morse,R., O'Hanlon,K., and Collins,M.D. (2002). Phylogenetic, amino acid content and indel analyses of the beta subunit of DNA-dependent RNA polymerase of gram-positive and gram-negative bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1477-1484.

- Muzzin,O., Campbell,E.A., Xia,L., Severinova,E., Darst,S.A., and Severinov,K. (1998). Disruption of *Escherichia coli* hepA, an RNA polymerase-associated protein, causes UV sensitivity. *J. Biol. Chem.* 273, 15157-15161.
- Panek,J., Krasny,L., Bobek,J., Jezkova,E., Korelusova,J., and Vohradsky,J. (2010). The suboptimal structures find the optimal RNAs: homology search for bacterial non-coding RNAs using suboptimal RNA structures. *Nucleic Acids Res.*
- Pasman,Z. and von Hippel,P.H. (2000). Regulation of rho-dependent transcription termination by NusG is specific to the *Escherichia coli* elongation complex. *Biochemistry* 39, 5573-5585.
- Paul,B.J., Barker,M.M., Ross,W., Schneider,D.A., Webb,C., Foster,J.W., and Gourse,R.L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* 118, 311-322.
- Perederina,A., Svetlov,V., Vassilyeva,M.N., Tahirov,T.H., Yokoyama,S., Artsimovitch,I., and Vassilyev,D.G. (2004). Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* 118, 297-309.
- Peters,J.M., Mooney,R.A., Kuan,P.F., Rowland,J.L., Keles,S., and Landick,R. (2009). Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 15406-15411.
- Polyakov,A., Severinova,E., and Darst,S.A. (1995). Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell* 83, 365-373.
- Richardson,J.P. (2002). Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim. Biophys. Acta* 1577, 251-260.
- Roberts,J. and Park,J.S. (2004). Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 120-125.
- Rutherford,S.T., Lemke,J.J., Vrentas,C.E., Gaal,T., Ross,W., and Gourse,R.L. (2007). Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 366, 1243-1257.
- Severinov,K. (2000). RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 118-125.
- Sevim,E., Gaballa,A., Belduz,A.O., and Helmann,J.D. (2011). DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* and *Aeribacillus pallidus* AC6 sigma(D) proteins. *J. Bacteriol.* 193, 575-579.
- Sonenshein,A.L. (2005). CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 203-207.
- Srivatsan,A. and Wang,J.D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 100-105.
- Stallings,C.L., Stephanou,N.C., Chu,L., Hochschild,A., Nickels,B.E., and Glickman,M.S. (2009). CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell* 138, 146-159.
- Steitz,T.A., Smerdon,S.J., Jager,J., and Joyce,C.M. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* 266, 2022-2025.

- Sukhodolets, M.V., Cabrera, J.E., Zhi, H., and Jin, D.J. (2001). RapA, a bacterial homolog of SWI2/SNF2, stimulates RNA polymerase recycling in transcription. *Genes Dev.* *15*, 3330-3341.
- Sukhodolets, M.V. and Jin, D.J. (2000). Interaction between RNA polymerase and RapA, a bacterial homolog of the SWI/SNF protein family. *J. Biol. Chem.* *275*, 22090-22097.
- Symersky, J., Perederina, A., Vassilyeva, M.N., Svetlov, V., Artsimovitch, I., and Vassilyev, D.G. (2006). Regulation through the RNA polymerase secondary channel. Structural and functional variability of the coiled-coil transcription factors. *J. Biol. Chem.* *281*, 1309-1312.
- Takahashi, K., Kasai, K., and Ochi, K. (2004). Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 4320-4324.
- Turnbough, C.L., Jr. (2008). Regulation of bacterial gene expression by the NTP substrates of transcription initiation. *Mol. Microbiol.* *69*, 10-14.
- Vrentas, C.E., Gaal, T., Berkmen, M.B., Rutherford, S.T., Haugen, S.P., Vassilyev, D.G., Ross, W., and Gourse, R.L. (2008). Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *J. Mol. Biol.* *377*, 551-564.
- Wassarman, K.M. (2007). 6S RNA: a small RNA regulator of transcription. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 164-168.
- Wassarman, K.M. and Saecker, R.M. (2006). Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* *314*, 1601-1603.
- Wassarman, K.M. and Storz, G. (2000). 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* *101*, 613-623.
- Westblade, L.F., Campbell, E.A., Pukhrambam, C., Padovan, J.C., Nickels, B.E., Lamour, V., and Darst, S.A. (2010). Structural basis for the bacterial transcription-repair coupling factor/RNA polymerase interaction. *Nucleic Acids Res.* *38*, 8357-8369.
- Xue, X., Tomasch, J., Sztajer, H., and Wagner-Dobler, I. (2010). The delta subunit of RNA polymerase, RpoE, is a global modulator of *Streptococcus mutans* environmental adaptation. *J. Bacteriol.* *192*, 5081-5092.
- Yang, X., Molimau, S., Doherty, G.P., Johnston, E.B., Marles-Wright, J., Rothnagel, R., Hankamer, B., Lewis, R.J., and Lewis, P.J. (2009). The structure of bacterial RNA polymerase in complex with the essential transcription elongation factor NusA. *EMBO Rep.* *10*, 997-1002.
- Yeh, H.Y., Chen, T.C., Liou, K.M., Hsu, H.T., Chung, K.M., Hsu, L.L., and Chang, B.Y. (2011). The core-independent promoter-specific interaction of primary sigma factor. *Nucleic Acids Res.* *39*, 913-925.